

# PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2004-012215

(43)Date of publication of application : 15.01.2004

(51)Int.Cl.

G01N 27/28  
C12M 1/34  
G01N 27/416  
G01N 33/483

(21)Application number : 2002-163934

(71)Applicant : MATSUSHITA ELECTRIC IND CO LTD

(22)Date of filing : 05.06.2002

(72)Inventor : NAKATANI MASAYA  
OKA HIROAKI  
EMOTO FUMIAKI

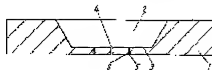
## (54) EXTRACELLULAR ELECTRIC POTENTIAL MEASURING DEVICE AND ITS MANUFACTURING METHOD

### (57)Abstract:

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To provide a solution for the problem that a traditional extracellular electric potential measuring device used for medicine screening may be unable to sense potential at a high signal to noise ratio if sufficient adhesion to a detector of a cell cannot be kept.

**SOLUTION:** The device is provided with both a substrate 1 and at least one well 2 which mixes a subject cell 10 and a medicine responding to this subject cell 10, in the substrate 1. At the bottom of this well 2, there are a first aperture 4, a second aperture 5 and a hollow section 6. The first aperture 4 and the second aperture 5 are connected each other via the hollow section 6, where the first aperture 4 is smaller than the hollow section 6 but larger than the second aperture 5 in diameter, and smaller than the subject cell 10 in size.

1 シリコン基板  
2 ウエル  
4 第一開口部  
5 第二開口部  
6 中空部  
10 細胞



(19) 日本国特許庁 (JP)

## (12) 公 開 特 許 公 報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2004-12215

(P2004-12215A)

(43) 公開日 平成16年1月15日 (2004.1.15)

(51) Int. Cl. <sup>7</sup>	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 27/28	G O 1 N 27/28	2 G O 4 5
C 1 2 M 1/34	G O 1 N 27/28	4 B O 2 9
G O 1 N 27/416	C 1 2 M 1/34	A
G O 1 N 33/483	G O 1 N 33/483	F
	G O 1 N 27/46 3 4 1 M	
審査請求 未請求 請求項の数 20 O L (全 18 頁) 最終頁に続く		
(21) 出願番号	特願2002-163934 (P2002-163934)	(71) 出願人
(22) 出願日	平成14年6月5日 (2002.6.5)	000005821 松下電器産業株式会社 大阪府門真市大字門真1006番地
		(74) 代理人
		100097445 弁理士 岩橋 文雄
		(74) 代理人
		100103355 弁理士 坂口 智康
		(74) 代理人
		100109667 弁理士 内藤 浩樹
		(72) 発明者
		中谷 将也 大阪府門真市大字門真1006番地 松下 電器産業株式会社内
		(72) 発明者
		岡 弘章 大阪府門真市大字門真1006番地 松下 電器産業株式会社内
		最終頁に続く

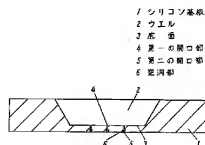
(54) 【発明の名称】 細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法

(57) 【要約】

【課題】薬品スクリーニングに用いられる細胞外電位測定用デバイスにおいて、細胞の検出部への密着保持が十分でない場合には、高いS/N比で検出ができなくなるという問題がある。

【解決手段】基板1と、この基板内に被検体細胞10及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウエル2を有し、このウエル2の底部に第一の開口部4、第二の開口部5及び空洞部6を有しており、第一の開口部4と第二の開口部5は空洞部6を介して連結され、第一の開口部4の径は空洞部6の径より小さく、第二の開口部5より大きい構造であり、なおかつ被検体細胞10の大きさより小さい構成とする。

【選択図】 図2



## 【特許請求の範囲】

## 【請求項 1】

基板と、この基板内に被検体細胞及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウェルを有し、このウェルの底部に第一の開口部、第二の開口部及び空洞部を有し、第一の開口部と第二の開口部は空洞部を介して一直線上に連結されることで細胞トラップ孔を構成しており、上記第一の開口部の空洞部側に接続する径は空洞部の径より小さく、第二の開口部の空洞部側に接する径より大きく、なおかつ被検体細胞の大きさより小さい細胞外電位あるいは細胞の発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 2】

基板がシリコンよりなる請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

10

## 【請求項 3】

基板が少なくとも 2 種類の材料からなる積層体であり、2 種類の材料は同一の溶液あるいはガスに対してそれぞれ異なるエッチングレートを持つ請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 4】

基板がシリコンと二酸化珪素もしくは二酸化珪素を含むガラス材料との積層体である請求項 3 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 5】

第二の開口部の壁面と空洞部の一部においてのみ、導体材料が形成されており、これら導体はウェル側とは電気的に絶縁されている請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

20

## 【請求項 6】

第一の開口部の壁面はウェル側の方が空洞部側より大きくなるテーパ構造である請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 7】

第一の開口部のウェル側の大きさは被検体細胞の大きさの 2 倍より小さい請求項 6 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 8】

空洞部の形状は縦径より横径の方が大きい楕円形状であり、さらに縦径は被検体細胞より小さい形状とした請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 9】

同一のウェルの底面に、第一の開口部、空洞部、第二の開口部からなる細胞トラップ孔を複数形成してなる請求項 1 に記載の細胞外電位測定デバイス。

30

## 【請求項 10】

同一のウェルの底面に形成した細胞トラップ孔の第二の開口部の壁面に形成された導体は、ウェルの下面において互いに短絡されている請求項 9 に記載の細胞外電位測定デバイス。

## 【請求項 11】

第一の開口部の空洞部に接続する側の大きさは 10～50 マイクロメートルであり、第二の開口部は 1～5 マイクロメートルであり、空洞部の横径が 10～100 マイクロメートルであり、空洞部の縦径は 50 マイクロメートル以下である請求項 8 に記載の細胞外電位測定デバイス。

40

## 【請求項 12】

基板にキャビティをエッチングしてウェルを形成する工程と、このウェルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの 2 種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウェルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの 2 種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第二の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチン

50

グを行って第一の開口部と第二の開口部の連結部に空洞部を形成する工程からなる細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 13】

エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である請求項 12 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 14】

第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく請求項 12 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 15】

第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においては、エッチングを抑制するガスのみを流して生成物を第一の開口部の壁面に形成する請求項 12 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 16】

基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの 2 種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの 2 種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第一の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部の連結部に空洞部を形成する工程とからなる細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 17】

エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である請求項 16 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 18】

第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく請求項 16 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 19】

第二の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においては、エッチングを抑制するガスのみを流して生成物を第一の開口部の壁面に形成する請求項 16 に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項 20】

第一の開口部側と、第二の開口部と、空洞部を形成した後、第一の空洞部より蒸着法またはスパッタ法によって導体材料を第二の開口部と空洞部の一部に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は生体試料特に細胞の電気生理学的評価をこれら生体試料が発する電気化学的变化を指標にして、簡易に高速に行う細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法に関するも

のであり、たとえば高速薬品スクリーニング装置に用いられる。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞の電氣的活動を指標にして薬品をスクリーニングすることはパッチクランプ法、蛍光色素または発光指示薬を用いる方法により行われている。

【0003】

このパッチクランプ法はマイクロピペットの先端部分に付けた細胞膜の微小部分（パッチと呼ぶ）を用いて、単一のチャネルタンパク質分子を介するイオンの輸送を微小電極プローブによって電氣的に記録する方法であり、この方法は一個のタンパク質分子の機能をリアルタイムで調べることでできる数少ない方法の一つである（たとえば、細胞の分子生物学、第三版、Garland Publishing Inc.、New York、1994、日本語版、中村桂子ら監訳、181～182頁、1995年、教育社）。

【0004】

また、特定のイオンの濃度変化に応じて光を発する蛍光色素または発光指示薬により、細胞内のイオンの移動をモニタすることで細胞の電氣的活動を測定する方法もある。

【0005】

しかし、パッチクランプ法ではマイクロピペットの作成及び操作に特殊な技術を必要とし、一つの試料の測定に多くの時間を要するため大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングする用途には適していない。また、蛍光色素などを利用する方法は大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングできるが、細胞を染色する工程が必要で測定においては色素の影響によるバックグラウンドが高い上に時間とともに脱色するためS/N比が悪いという欠点がある。

【0006】

これに代わる方法として、既に特願2001-001980号および特願2001-170341号により開示される方法は、パッチクランプ法で得られるデータと同等の高品質なデータが得られ、しかも蛍光色素を用いる方法のように簡易に高速で大量の試料を測定できるものである。これらの先行文献では、基板上に設けられた細胞の保持手段を有する少なくとも一つのウエルと、このウエルに電気信号を検出するセンサー手段とを有する細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する、いわゆる細胞外電位測定用デバイスについて開示されている。今少し、上記先行文献で開示される細胞外電位測定用デバイスの動作について図面を用いて説明する。

【0007】

図30は上記先行文献で開示される細胞外電位測定デバイスのウエル構造を模式図で示したものであり、ウエル92内に培養液が入られ、被検体細胞94は基板91に設けられた細胞保持手段によって捕捉または保持されている。細胞保持手段は、基板91に形成された窪み93および開口部95を介してこの窪み93に連絡する穴または貫通孔97を備えている。さらに、貫通孔97の中にはセンサー手段である測定用電極99が配置されており、この測定用電極99は配線98を経て信号検出部に連結されている。測定の際には、被検体細胞94を貫通孔97側から吸引ポンプなどの手段により、この被検体細胞94が窪み93部分に密着保持される。こうして、被検体細胞94の活動により発生する電気信号はウエル92中の培養液側に漏れることなく、貫通孔97側に設けた測定用電極99によって検出されるのである。

【0008】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、上記の方法には被検体細胞94の窪み93部分への密着保持が十分でない場合には細胞活動により発生する電気信号がウエル92中の培養液に漏れてしまい、高いS/N比で検出ができなくなるといった問題もある。これはウエル92内に設けられた窪み93、開口部95、貫通孔97の形状が被検体細胞94の形状と合わない場合や、被検体細胞94の窪み93への付着力が弱い場合に発生する。

【0009】

本発明はこのような問題に鑑み、確実に被検体細胞を保持する手段を提供するものである。

【0010】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明の請求項1に記載の発明は、基板と、この基板内に被検体細胞及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウェルを有し、このウェルの底部に第一の開口部、第二の開口部及び空洞部を有し、第一の開口部と第二の開口部は空洞部を介して一直線上に連結されることで細胞トラップ孔を構成しており、上記第一の開口部の空洞部側に接続する径は空洞部の径より小さく、第二の開口部の空洞部側に接する径より大きく、なおかつ被検体細胞の大きさより小さい細胞外電位あるいは細胞の発する物理化学的変化を測定する細胞外電位測定デバイスであり、確実に被検体細胞を空洞部の中に閉じこめることができるので、細胞活動によって発生する電気的信号を確実に検出することができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0011】

請求項2に記載の発明は、基板がシリコンよりなる請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、基板材料がシリコンとすることにより第一の開口部、第二の開口部、空洞部の形成が半導体技術を用いて容易になるという製造上の利点を有する。またシリコンの表面は容易で酸化できるので、空洞部を境にして第一の開口部側と第二の開口部側の電気的絶縁を容易に確保できるという利点も有する。

【0012】

請求項3に記載の発明は、基板が少なくとも2種類の基板よりなる積層体であり、2種類の材料は同一の溶液あるいはガスに対してそれぞれ異なるエッチングレートを持つ細胞外電位測定用デバイスであり、基板材料が異なるエッチングレートを持つ2種類の積層体となることにより、第一の開口部、第二の開口部、空洞部の形成が半導体技術を用いて容易になるという製造上の利点を有する。

【0013】

請求項4に記載の発明は、基板がシリコンと二酸化珪素もしくはこれを含むガラス材料との積層体である細胞外電位測定デバイスであり、請求項3と同様の作用効果を有する。さらに、空洞部が二酸化珪素もしくはこれを含むガラス材料の層に形成されていると、これらの層はシリコンに比べて十分に電気絶縁性が高いので、第一の開口部側と第二の開口部側の電気的絶縁が十分に確保できるという利点も有する。

【0014】

請求項5に記載の発明は、第二の開口部の壁面と空洞部の一部においてのみ、導体材料が形成されており、これら導体はウェル側とは電気的に絶縁されている細胞外電位測定デバイスであって、第二の開口部周辺で発生する電気を第一の開口部側に漏らすことなく、確実に検出することができる。

【0015】

請求項6に記載の発明は、第一の開口部の壁面はウェル側の方が空洞部側より大きくなるテーパー形状である細胞外電位測定デバイスであり、上記のように第一の開口部の壁面がテーパー形状となっていることにより、ウェル側から被検体細胞が細胞がより進入しやすくなるという利点を有する。

【0016】

請求項7に記載の発明は、第一の開口部のウェル側の大きさは被検体細胞の大きさの2倍より小さい細胞外電位測定デバイスであり、第一の開口部のウェル側の大きさが被検体細胞の大きさの2倍より小さいので、複数の細胞がウェルから同時に進入して第一の開口部の内部で詰まってしまうことがない。

【0017】

請求項8に記載の発明は、空洞部の形状は縦径より横径の方が大きい楕円形状である細胞外電位測定デバイスであり、空洞部が楕円形状であることに加えて縦径の大きさが被検体細胞より小さいので、ウェル側より空洞部に被検体細胞が進入すると、被検体細胞は空洞

部内において横径方向につぶれるようになり、また縦方向から押さえられるので、被検体細胞は確実に空洞部内に保持される。

【0018】

請求項9に記載の発明は、同一のウエルの底面に第一の開口部、空洞部、第二の開口部からなる細胞トラップ孔を複数形成してなる細胞外電位測定デバイスであり、同一ウエルの底面に複数の細胞トラップ孔があるので、測定の際にはいずれかの細胞トラップ孔に被検体細胞が保持されれば測定が可能になるという利点を有する。

【0019】

請求項10に記載の発明は、同一のウエルの底面に形成した細胞トラップ孔の第二の開口部の壁面に形成された導体がウエルの下面において互いに短絡されている細胞外電位測定デバイスであり、第二の開口部の壁面に設けられた導体が短絡されているので、細胞トラップ孔にそれぞれ被検体細胞が保持されている場合において、これらの被検体細胞外の電位変化を並列に接続することとなり、一つ一つの被検体細胞の電位変化が少なくても確実に捉えることができる。

【0020】

請求項11に記載の発明は、第一の開口部の空洞部に接続する側の大きさは10～50マイクロメートルであり、第二の開口部は1～5マイクロメートルであり、空洞部の横径が10～100マイクロメートルであり、空洞部の縦径は50マイクロメートル以下である細胞外電位測定デバイスであり、このような形状は数十マイクロメートルの被検体細胞をウエル側から進入させ、空洞部内に保持するために最適である。

【0021】

請求項12に記載の発明は、基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第二の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部の連結部に空洞部を形成する工程とからなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、被検体細胞を空洞部内に進入させ、確実に保持するための構造である第一の開口部、第二の開口部、空洞部によって構成される細胞トラップ孔の製造方法を提供することができる。

【0022】

請求項13に記載の発明は、エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、第一の開口部、第二の開口部、空洞部の製造方法をさらに容易にするための方法であり、請求項12に記載の発明における効果を補完する。

【0023】

請求項14に記載の発明は、第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッチングを促進するガスの割合を減らすことにより第一の開口部は、ウエル側より空洞部側の開口部の方が小さいテーパ形状とすることができ、ウエルからの被検体細胞の進入を促進させやすくするものである。

【0024】

請求項15に記載の発明は、第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においてはエッチングを抑制するガスのみを用いて、保護膜を第一の開口部壁面に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、後の工程で第二の開口部側が

らエッチングを促進するガスのみを用いて空洞部を形成する際にも、第一の開口部の壁面には保護膜が形成されているので、エッチングを促進するガスによって第一の開口部壁面がエッチングされない製造方法を実現することができる。

【0025】

請求項16に記載の発明は、基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第一の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部を連結部に空洞部を形成する工程とからなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、被検体細胞を空洞部内に入らせ、確実に保持するための構造である第一の開口部、第二の開口部、空洞部によって構成される細胞トラップ孔の製造方法を提供することができる。

【0026】

請求項17に記載の発明は、エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、第一の開口部、第二の開口部、空洞部の製造方法をさらに容易にするための方法であり、請求項16記載の発明における効果を補完する。

【0027】

請求項18に記載の発明は、第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッチングを促進するガスの割合を減らすことにより第一の開口部はウエル側より空洞部側の開口部の方が小さいテーパ形状とすることができ、ウエルからの被検体細胞の進入を促進させることができる。

【0028】

請求項19に記載の発明は、第二の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においては、エッチングを抑制するガスのみを用いて保護膜を第二の開口部壁面に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、後の工程で第一の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いて空洞部を形成する際にも、第二の開口部の壁面には保護膜が形成されているのでエッチングを促進するガスによって第二の開口部壁面がエッチングされることはないのである。

【0029】

請求項20に記載の発明は、第一の開口部側と、第二の開口部と、空洞部を形成した後、第一の空洞部より蒸着法またはスパッタ法によって導体材料を第二の開口部と空洞部の一部に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、この方法により、空洞部の上部には導体が形成されないので、空洞部に境に第一の開口部側と第二の開口部側の電気的絶縁を確実に確保する製造方法を提供することができる。

【0030】

【発明の実施の形態】

以下、本発明の細胞外電位測定デバイスおよびその製造法について実施の形態および図面を用いて説明する。

【0031】

(実施の形態1)

本発明の実施の形態1及び図1～図22、図29により請求項1、2、および請求項5～20に記載の発明を説明する。図1は本発明の実施の形態における細胞外電位測定デバイ



スの一実施の形態を示した斜視図であり、図2はその断面図、図3は同断面図の拡大図である。

#### 【0032】

図1～図3の細胞外電位測定デバイスは、シリコンよりなる基板1にウエル2が設けられ、このウエル2の底面3には第一の開口部4と第二の開口部5が空洞部6を介してこれら是一直線上に連結されており、これらにより細胞トラップ孔が複数個構成されている。第一の開口部4の径は空洞部6より小さく、第二の開口部5より大きい。

#### 【0033】

これらの具体的な大きさは、被検体細胞の大きさによって最適に決められるものであるが、大きさの順番は変わるものではない。たとえば被検体細胞の径を25マイクロメートルであるとすると、第一の開口部4は25マイクロメートルより小さい20マイクロメートルとし、空洞部6の径は被検体細胞の大きさより大きい35マイクロメートルとし、第二の開口部5は被検体細胞より小さい10マイクロメートル程度としておけばよい。この他、被検体細胞の大きさは小さいもので数マイクロメートル、大きいもので数十マイクロメートルであるので、第一の開口部4は10～50マイクロメートル、第二の開口部5は1～5マイクロメートル程度とし、空洞部6の大きさはこれらの大きさによって10～100マイクロメートルの間で最適な値とすることが望ましい。

#### 【0034】

さらに、図3に示すように少なくとも第二の開口部5の内壁面と空洞部6の下方には金よりなる検出電極7が形成されており、基板1の下面側には金よりなる引き出し電極8が設けられている。検出電極7と引き出し電極8は第二の開口部5で電気的に接続されている。一方、空洞部6の側面および上方には導体は設けられていないので、検出電極7はウエル2側と電気的に絶縁されている。

#### 【0035】

さて、この細胞外電位測定用デバイスの使用方法について図面を用いて少し説明する。図4は細胞外電位測定用デバイスに被検体細胞10と培養液11をウエル2に投入したときの様子を断面図で示しており、図5～図9は第一の開口部4、第二の開口部5、空洞部6の部分の拡大断面図である。

#### 【0036】

さて、図4にあるようにウエル2内に培養液11と被検体細胞10を入れると、当初、この被検体細胞10は培養液11中に浮遊している。また、培養液11はウエル2内だけでなく、第一の開口部4、空洞部6、第二の開口部5を満たした後、第二の開口部5側にも流れ出す。このようにすると、浮遊している被検体細胞10はウエル2内の圧力によって、図6に示すように第一の開口部4へ引き込まれる。引き込みの圧力が足りない場合には、第二の開口部5側から吸引ポンプなどの手段により吸引すると、より確実に浮遊している被検体細胞10は第一の開口部4側に吸引される。

#### 【0037】

さて、第一の開口部4の大きさは被検体細胞10より小さくなるよう設計しているので、図7に示すように被検体細胞10は第一の開口部4を通るときに抵抗を受けるが吸引によって力を受けているので、空洞部6へ到達することができる。図8に示すように、空洞部6内に到達した被検体細胞10は、吸引を止めてもウエル2側より培養液11の圧力を受けている上、第一の開口部4を通るにはサイズが大きく、第一の開口部4はほぼ垂直なため、ウエル2側から吸引されるなどの外力がない限り、簡単にはウエル2側に戻ることができなくなり、空洞部6内に保持される。

#### 【0038】

さらに、空洞部6の形状を図のように縦径より横径が大きい楕円形状にし、縦径が被検体細胞10より小さくなるようにしておけば、被検体細胞10は確実に空洞部6内に保持される。このような状態で、ウエル2内の培養液11に薬剤（図示せず）を投与すれば、薬剤は培養液11内に浸透し、図9のように被検体細胞10が活性化した場合に、第二の開口部5で発生した電気信号は、第二の開口部5に満たされている培養液11の電位を変化

させることになるので、この電位の変化は培養液 11 に接している検出電極 7 及び引き出し電極 9 によって外部に取り出される。

【0039】

このように、本発明の細胞外電位測定用デバイスでは、検出電極 7 はウエル 2 側とは電気的に絶縁されており、測定の際には被検体細胞 10 は確実に空洞部 6 内に保持されている。つまり、第二の開口部 5 側の培養液 11 とウエル 2 側の培養液 11 とは電気的に絶縁された状態にあるので、細胞の活動により発生する電気信号は、ウエル 2 側の培養液 11 に漏れることなく、第二の開口部 5 側に設けた検出電極 7 によって検出されるのである。

【0040】

さらに、第一の開口部 4 は図 29 に示すように、ウエル 2 側の方が穴径が広いテーパ形状となっても良い。この場合は、ウエル 2 側から被検体細胞 10 の進入をより容易にする。一方で、第一の開口部 4 の空洞部 6 の大きさを空洞部 6 より小さくしておけば、ウエル 2 側へ被検体細胞 10 が戻ることも防げる。これにより、空洞部 6 へ入った被検体細胞 10 はウエル 2 側へは戻らず保持されるので、より細胞の保持率の高い細胞外電位測定デバイスとすることができる。なお、この場合の開口部の大きさの関係は、大きいものから順に空洞部 6 の大きさ、第一の開口部 4 の空洞部側の大きさ、第二の開口部 5 の大きさとすればよい。

【0041】

なお、本発明の細胞外電位測定デバイスでは、被検体細胞 10 が細胞トラップ孔の中に進入すると、ウエル 2 側に戻ることはできなくなるが、一度、被検体細胞 10 の測定を行うとウエル 2 および細胞トラップ孔内部が汚染されるため、再利用はせず使い捨てになるので被検体細胞 10 を取り出す必要はない。

【0042】

次に本発明の細胞外電位測定用デバイスを製造する手順について図面を用いて説明する。図 10～図 19 はこの製造手順を説明するための細胞外電位測定用デバイスの断面図である。

【0043】

まず、図 10 に示すように、シリコン基板 1 にフォトリソグラフィによってウエル 2 を形成するためのレジストマスク 12 を形成し、次に図 11 に示すように所定の深さになるまでエッチングを行いウエル 2 を形成する。このときのエッチング方法にはウェットエッチングとドライエッチングがあるが、ウェットエッチングの場合は KOH や TMAH (水酸化テトラ・メチル・アンモニウム液) などのエッチング液、ドライエッチングの場合には SF<sub>6</sub>、CF<sub>4</sub> などのエッチングガスを用いることができる。

【0044】

次に図 12 に示すように、第一の開口部 4 を形成するためのレジストマスク 13 と、第二の開口部を形成するためのレジストマスク 14 をそれぞれ、ウエル 2 の底面およびシリコン基板 1 の下面に形成する。このとき、第一の開口部 4 と第二の開口部 5 の大きさは被検体細胞 10 の大きさによって変える必要があるが、少なくとも第一の開口部 4 の方が第二の開口部 5 より大きくなるようにする。

【0045】

次に図 13 に示すように、ウエル 2 側から第一の開口部 4 のエッチングを所定の深さになるまで行う。このときエッチングの方法としては、ドライエッチングが望ましく、なおかつエッチングガスとしてエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスを用いる。エッチングを促進するガスには SF<sub>6</sub>、CF<sub>4</sub> などを用いるが、これらはシリコンのエッチングを深さ方向だけではなく、横方向へも促進する作用がある。そこで、CHF<sub>3</sub>、C<sub>2</sub>F<sub>6</sub> 等のエッチングを抑制するガスを混合しておくことで、エッチングの壁面に CF<sub>2</sub> のポリマーである保護膜を作成するので、エッチングをエッチングマスクの下の方みに進行させることが可能なのである。

【0046】

また、別の方法として、エッチング形状をさらに垂直なものにしたい場合には、エッチン

グを促進するガスによってエッチングを少しだけ行った後、エッチングを抑制するガスによって保護膜を少しだけ形成する工程を繰り返すことで、ほぼ垂直なエッチング形状とすることができる。実験では、大きさ20マイクロメートルの第一の開口部4を形成するのに、 $SF_6$ を130 sccm流して13秒間プラズマ発生させることで約1マイクロメートルのエッチングを行い、その後 $CF_4$ を85 sccm流して7秒間プラズマ発生させて約0.01マイクロメートルの保護膜を形成し、またエッチングを行ういうことを約60回繰り返した結果、60マイクロメートルの深さのほぼ垂直なエッチング形状とすることができる。

【0047】

なお、エッチングを抑制するガスによって保護膜は第一の開口部4の壁面だけでなく、底面にも形成されるが、底面に形成された保護膜は壁面に形成された保護膜に比べてエッチングを促進するガスによって容易に除去されるので、エッチングは下方のみに進むのである。

【0048】

さらに、このときのエッチング工程においては、エッチングを終了する直前はエッチングを抑制するガスによって保護膜を形成することで終了しておけば、第一の開口部4の壁面には確実に保護膜が形成されるので、後の工程において、空洞部6を形成する際にも第一の開口部4の壁面が侵されることがない。

【0049】

次に、図14に示すように、ウェル2の下面側から第二の開口部5を形成するためのエッチングを行う。ここでも第一の開口部4を形成する際と同様、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの切り替えによるエッチングを行って壁面をほぼ垂直になるよう形成しておく。

【0050】

さらに、第一の開口部4の場合と同様、エッチングを終了する直前にはエッチングを抑制するガスによって保護膜を形成して終了しておく。これにより、第二の開口部5の壁面にも保護膜が確実に形成されるので、後の工程において空洞部6を形成する際にも第二の開口部5壁面が侵されることがない。

【0051】

次に、図15に示すように第一の開口部4側から、エッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行う。先ほどの工程で、第一の開口部4の壁面には保護膜が形成されているので、壁面はエッチングによって侵されることがなく、下方にエッチングが進むが、新しくエッチングされたところには保護膜が形成されないで、横方向にもエッチングが進むことになり、結果的に図15に示すように、第一の開口部4と第二の開口部5の間に第一の開口部4より広がった空洞部6が形成されるのである。このエッチング量を適当な量行えば、空洞部6の形状は楕円の方が大きい楕円形状となるのである。

【0052】

なお、空洞部6のエッチングの際には第二の開口部5側に貫通された後も第二の開口部5の壁面にも保護膜が形成されているので、空洞部6の大きさが所望の大きさとなるまでしばらくエッチングを続けても、第二の開口部5の壁面が侵されることはない。ここで、あまりエッチングを続けると、横方向のみではなく、図15の点線に示すように全体に広がった形状となるので、適当なところで止める必要がある。

【0053】

なお、この工程におけるエッチングを促進するガスは $SF_6$ 、 $CF_4$ が利用できるが、望ましくは $XeF_2$ がもっとも適している。これはこのガスでは保護膜がほとんどエッチングされないで、壁面をほとんど侵することなく空洞部6を形成することが可能なのである。ただし、このガスの場合は、前工程で形成されたエッチング底面の保護膜をエッチングする速度も遅くなるので、これを回避するため、 $XeF_2$ によるエッチングをする前に $SF_6$ 、 $CF_4$ 、 $Ar$ ガスなどを用いて底面の保護膜のみをエッチングすればよい。

【0054】

なお、本実施の形態 1 では第一の開口部 4、第二の開口部 5、空洞部 6 の順番でエッチングを行ったが、この順番は、第二の開口部 5、第一の開口部 4、空洞部 6 の順番、あるいは第一の開口部 4、空洞部 6、第二の開口部 5 の順番でも可能である。また、空洞部 6 のエッチングは第二の開口部 5 側よりエッチングすることも可能であるが、この場合は、空洞部 6 が第一の開口部 4 より大きくなるようにエッチング量に注意する必要がある。

【0055】

さて、次に、図 16 に示すように、すべてのレジストマスクを除去した後、第一の開口部 4 側から金を蒸着法により付着させ検出電極 7 を形成する。このように第一の開口部 4 側から金を蒸着により付着させるターゲットより放出された金粒子は直進性があるので第一の開口部 4 を通って、図 17 に示すように第一の開口部 4 の内壁、空洞部 6 部の下方及び第二の開口部 5 の内壁のみに蒸着される。つまり、検出電極 7 は第二の開口部 5 の内壁と空洞部 6 の下方にしか形成されないものである。

【0056】

そして、次に図 18 に示すように、第二の開口部 5 側より金よりなる引き出し電極 8 を蒸着によって形成する。このように形成すると、第二の開口部 5 は第一の開口部 4 より十分小さいので、やはり金粒子の直進性によって、第二の開口部 5 の内壁と第一の開口部 4 の内壁の一部にしか金は付着しない。つまり、図 19 でも明らかなように、空洞部 6 の下方と第二の開口部 5 に形成された検出電極 7 と第一の開口部 4 の内壁に形成された金は電気的に絶縁されているのである。ここで、金のみでは基板 1 への密着性が悪い場合はクロム、チタンなどをパフア層として積層することができる。また、ウエル 2 の底面へ金が蒸着されると不都合がある場合には、少なくとも第一の開口部 4 を形成するために設けたレジストマスク 12 を除去する前に金を蒸着すれば、その後レジストマスク 12 を除去した後は金はウエル 2 の底部には形成されないことになる。なお、ここでは金の形成は蒸着法としたが、スパッタ法でも同様の効果は得られる。

【0057】

このようにして、本実施の形態による製造方法によれば、シリコンよりなる基板 1 に、ウエル 2 と、ウエル 2 内に第一の開口部 4 と第二の開口部 5 と空洞部 6 を有し、これら構造によって被検体細胞を確実に空洞部 6 内に保持することのできる信頼性の高い細胞外電位測定用デバイスを得ることができるのである。

【0058】

なお、本実施の形態 1 では基板 1 をシリコンとしたが、ドライエッチングが可能で、ガスの切り替えによって直進性エッチングと横方向エッチングが実現できる基板材料であれば本発明の方法は適用できる。たとえばガラス基板や石英基板は  $SiF_4$ 、 $CF_4$ 、などのガスにより直進性エッチングが可能で、HF ガラスによって横方向のエッチングが可能である。

【0059】

なお、本実施の形態 1 では、第一の開口部 4 はほぼ垂直な穴となるようにしたが、第一の開口部 4 の壁面を空洞部 6 側の径よりウエル 2 側の径の方が大きいテーパー形状にしたい場合には、第一の開口部 4 をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル 2 側から空洞部 6 側に進むに従って、エッチングを促進するガスの割合を減らしていけばよい。これによって、図 20 のように第一の開口部 4 の壁面がテーパー形状となり、図 21 のように空洞部 6 を形成した後は被検体細胞 10 の進入をしやすく、空洞部 6 に入った被検体細胞 10 はウエル 2 側へ戻りにくい形状とすることができる。

【0060】

なお、第一の開口部 4 の壁面がテーパー形状となるようにするには、その他、エッチングを促進するガスのみでエッチングすることでも可能である。この場合は図 22 のようにレジストマスク 13 で作成した径よりウエル 2 側の第一の開口部 4 の大きさが広がるので、最適なテーパー形状となるようあらかじめレジストマスク 13 の大きさを決めておく必要がある。

【0061】

(実施の形態2)

本発明の実施の形態2及び図23～図28により請求項3、4に記載の発明を説明する。実施の形態2では、基板の材料としてシリコンと酸化珪素もしくはこれを含むガラス材料との積層体である場合について説明する。

【0062】

図23は本発明の実施の形態2における細胞外電位測定用デバイスの斜視図であり、図24はそれの断面図、図25は同拡大断面図である。実施の形態1と違うところは、基板21が第一のシリコン層22と二酸化珪素層23と第二のシリコン層24の積層体となっているところである。そして、第一の開口部26は第一のシリコン層22に、第二の開口部27は第二のシリコン層24に、空洞部28は二酸化珪素層23にそれぞれ形成されている。

【0063】

また、検出電極29は第二の開口部27の内壁と、空洞部28の下方のみに形成されており、引き出し電極30はウエル25の下面に形成されており、検出電極29と引き出し電極30は第二の開口部27付近で電気的に接続されている。

【0064】

これらによって構成された細胞外電位測定デバイスの動作は、実施の形態1で述べたものと同じになるので省略するが、二酸化珪素層23が第一のシリコン層22と第二のシリコン層24の間に挟まれているので、二酸化珪素層23は両者間の電気的絶縁を高め、第二の開口部27側で発生する細胞活動による電気的信号は、第一の開口部26側へ漏れることなく確実に、検出電極29によって検出できるのである。

【0065】

次に実施の形態2の細胞外電位測定用デバイスを製造するための手順について説明する。ここでは、実施の形態1と同じ方法による工程は説明を省略し、第一の開口部26、第二の開口部27、空洞部28を形成する工程のみについて説明する。また、基板材料はシリコン層、二酸化珪素層、シリコン層の順番で積層されたものを使用するが、これはSOI基板として一般に販売されているものであるから特段の説明はしない。

【0066】

まず、図26はウエル25を第一のシリコン層22に形成した後に、第一の開口部26、第二の開口部27を形成するためのレジストマスク31、32を形成したところである。そして次に図27の拡大断面図に示すように、ウエル25の底面および下面側よりドライエッチングによって壁面が垂直になるように、二酸化珪素層23に達するまでエッチングを行う。このとき、エッチングは実施の形態1と同様、エッチングを促進するガスと抑制するガスを用いる。さて、このように、二酸化珪素23が挟まれていることにより、第一の開口部26と第二の開口部27のエッチング時に、二酸化珪素層23に到達するまでエッチングすればよいので、所定のエッチング深さになるようエッチング時間を管理する必要が無いという製造上の利点がある。

【0067】

次に、HF溶液に浸けると、HF溶液はシリコン層をエッチングせず、二酸化珪素層23のみをエッチングするので、図28に示すように空洞部28が形成される。このときエッチング時間は、空洞部28が必要な横方向の大きさになるまでエッチングすればよい。そして、この後の工程は、実施の形態1と同様、検出電極29と引き出し電極30を形成すればよい。また、二酸化珪素23をエッチングする方法としては、他にHFガスを用いてプラズマエッチングを行っても良い。この場合はHF溶液の場合と同様、シリコン層をエッチングせず、二酸化珪素層23のみをエッチングできるので、実施の形態1にあるようにエッチングを長くしすぎると、楕円形状ではなくなってしまうということがない。

【0068】

以上のように、シリコンと二酸化珪素の2種類の層を積層した基板21を用いることにより、少なくとも第二の開口部27の深さと、空洞部28の高さがあらかじめ決まっている

ので、製造がより容易になることに加え、第一の開口部 2 6 側と第二の開口部 2 7 側は二酸化珪素層 2 3 によって電気的に完全に分離されているので、より信頼性の高い細胞外電位測定用デバイスを提供することができるのである。

【0069】

なお、本実施の形態 2 では、シリコン層と二酸化珪素層の 2 種類の材料層を用いて第一のシリコン層 2 2、二酸化珪素層 2 3、第二のシリコン層 2 4 の 3 層構造の基板 2 1 を用いたが、たとえばシリコン層、二酸化珪素層、シリコン層、二酸化珪素層のように 4 層構造ににしてもよい。

【0070】

また、シリコン層、二酸化珪素層、シリコン層の順番で積層させた基板 2 1 を用いたが二酸化珪素層、シリコン層、二酸化珪素層の順番に積層されたものでも可能である。さらに基板 2 1 を構成する材料としてはシリコンと二酸化珪素の組み合わせの他にシリコンとガラス、アルミとアルミナ、ガラスと樹脂など多数の組み合わせがある。また、基板 2 1 を構成する材料は 2 種類ではなく 3 種類とし、それぞれの層を変えても同様の効果が得られることが期待される。

【0071】

なお、実施の形態 1 と同様、第一の開口部 2 6 の壁面をテーパ形状にすることが可能であるが、効果、方法は実施の形態 1 で述べたものと同じであるので説明を省略する。

【0072】

【発明の効果】

以上のように本発明では、基板と、この基板内に被検体細胞及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウェルを有し、このウェルの底部に第一の開口部、第二の開口部及び空洞部を有し、第一の開口部と第二の開口部は空洞部を介して連結され、第一の開口部の径は空洞部の径より小さく、第二の開口部より大きい構造である細胞外電位測定デバイスを提供することによって、被検体細胞は第一の開口部を介して空洞部内に入ることができ、進入後は確実に被検体細胞を空洞部の中に閉じこめることができるので、細胞活動によって発生する電気的信号を確実に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】 本発明の実施の形態 1 による細胞外電位測定用デバイスの斜視図

【図 2】 同断面図

【図 3】 同断面拡大図

【図 4】 同使用方法を示す断面図

【図 5】 同拡大断面図

【図 6】 同拡大断面図

【図 7】 同拡大断面図

【図 8】 同拡大断面図

【図 9】 同拡大断面図

【図 10】 同細胞外電位測定用デバイスの製造方法を示す断面図

【図 11】 同断面図

【図 12】 同断面図

【図 13】 同拡大断面図

【図 14】 同拡大断面図

【図 15】 同拡大断面図

【図 16】 同拡大断面図

【図 17】 同拡大断面図

【図 18】 同拡大断面図

【図 19】 同拡大断面図

【図 20】 同他の製造方法の例を示す拡大断面図

【図 21】 同拡大断面図

【図 22】 同他の例を示す拡大断面図

【図 23】本発明の実施の形態 2 による細胞外電位測定用デバイスの斜視図

【図 24】同断面図

【図 25】同拡大断面図

【図 26】同製造方法を示す断面図

【図 27】同拡大断面図

【図 28】同拡大断面図

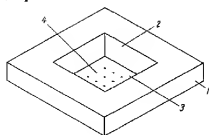
【図 29】本発明の実施の形態 1 による他の例の細胞外電位測定デバイスの断面図

【図 30】従来の細胞外電位測定デバイスの断面図

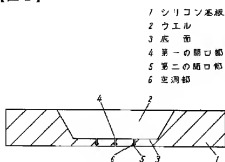
【符号の説明】

1	シリコン基板	10
2	ウェル	
3	底面	
4	第一の開口部	
5	第二の開口部	
6	空洞部	
7	検出電極	
8	引き出し電極	
10	被検体細胞	
11	培養液	
12	レジストマスク	20
13	レジストマスク	
14	レジストマスク	
15	金粒子	
16	金粒子	
21	基板	
22	第一のシリコン層	
23	二酸化珪素層	
24	第二のシリコン層	
25	ウェル	
26	第一の開口部	30
27	第二の開口部	
28	空洞部	
29	検出電極	
30	引き出し電極	
31	レジストマスク	
32	レジストマスク	

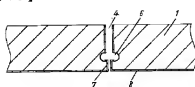
【図 1】



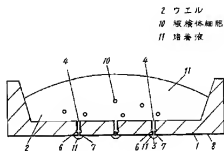
【図 2】



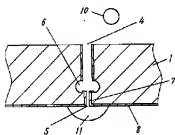
【図 3】



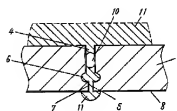
【図 4】



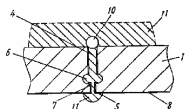
【図 5】



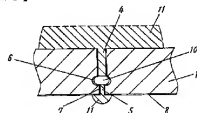
【図 7】



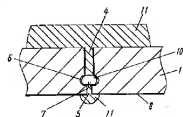
【図 6】



【図 8】

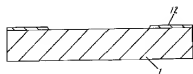


【図 9】

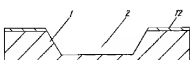




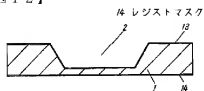
【図 10】



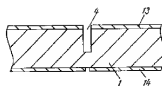
【図 11】



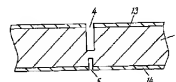
【図 12】



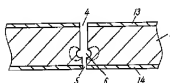
【図 13】



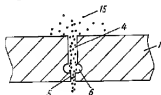
【図 14】



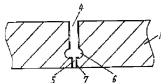
【図 15】



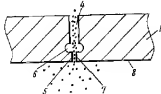
【図 16】



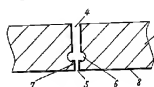
【図 17】



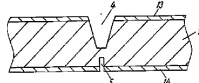
【図 18】



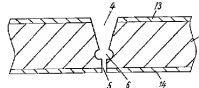
【図 19】



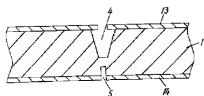
【図 20】



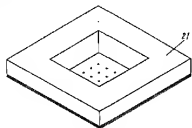
【図 21】



【図 2 2】



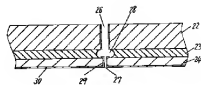
【図 2 3】



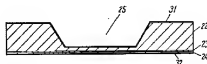
【図 2 4】



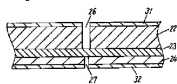
【図 2 5】



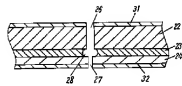
【図 2 6】



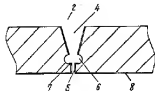
【図 2 7】



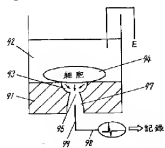
【図 2 8】



【図 2 9】



【図 3 0】



---

フロントページの続き

(51)Int.Cl.<sup>7</sup>

F I

テーマコード（参考）

G 0 1 N 27/46 3 8 6 Z

(72)発明者 江本 文昭

大阪府門真市大字門真 1 0 0 6 番地 松下電器産業株式会社内

F ターム（参考） 2G045 CB01 FB05 JA07

4B029 AA07 BB11 CC01 CC02 CC03 FA15

【公報種別】特許法第17条の2の規定による補正の掲載  
 【部門区分】第6部門第1区分  
 【発行日】平成17年10月13日(2005.10.13)

【公開番号】特開2004-12215(P2004-12215A)  
 【公開日】平成16年1月15日(2004.1.15)  
 【年通号数】公開・登録公報2004-002  
 【出願番号】特願2002-163934(P2002-163934)  
 【国際特許分類第7版】

G 0 1 N 27/28  
 C 1 2 M 1/34  
 G 0 1 N 27/416  
 G 0 1 N 33/483

【F I】

G 0 1 N 27/28 3 0 1 Z  
 G 0 1 N 27/28 P  
 C 1 2 M 1/34 A  
 G 0 1 N 33/483 F  
 G 0 1 N 27/46 3 4 1 M  
 G 0 1 N 27/46 3 8 6 Z

【手続補正書】

【提出日】平成17年6月1日(2005.6.1)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】全文

【補正方法】変更

【補正の内容】

【書類名】明細書

【発明の名称】細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法

【特許請求の範囲】

【請求項1】 基板と、この基板内に被検体細胞及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウエルを有し、このウエルの底部に第一の開口部、第二の開口部及び空洞部を有し、第一の開口部と第二の開口部は空洞部を介して一直線上に連結されることで細胞トラップ孔を構成しており、上記第一の開口部の空洞部側に接続する径は空洞部の径より小さく、第二の開口部の空洞部側に接する径より大きく、なおかつ被検体細胞の大きさより小さい細胞外電位あるいは細胞の発する物理化学的変化を測定する細胞外電位測定デバイス。

【請求項2】 基板がシリコンよりなる請求項1に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項3】 基板が少なくとも2種類の材料からなる積層体であり、2種類の材料は同一の溶液あるいはガスに対してそれぞれ異なるエッチングレートを持つ請求項1に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項4】 基板がシリコンと二酸化珪素もしくは二酸化珪素を含むガラス材料との積層体である請求項3に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項5】 第二の開口部の壁面と空洞部の一部においてのみ、導体材料が形成されており、これら導体はウエル側とは電気的に絶縁されている請求項1に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項6】 第一の開口部の壁面はウエル側の方が空洞部側より大きくなるテーパ構造である請求項1に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項7】 第一の開口部のウエル側の大きさは被検体細胞の大きさの2倍より小さ

い請求項6に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項8】 空洞部の形状は縦径より横径の方が大きい楕円形状であり、さらに縦径は被検体細胞より小さい形状とした請求項1に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項9】 同一のウエルの底面に、第一の開口部、空洞部、第二の開口部からなる細胞トラップ孔を複数形成してなる請求項1に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項10】 同一のウエルの底面に形成した細胞トラップ孔の第二の開口部の壁面に形成された導体は、ウエルの下面において互いに短絡されている請求項9に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項11】 第一の開口部の空洞部に接続する側の大きさは10～50マイクロメートルであり、第二の開口部は1～5マイクロメートルであり、空洞部の横径が10～100マイクロメートルであり、空洞部の縦径は50マイクロメートル以下である請求項8に記載の細胞外電位測定デバイス。

【請求項12】 基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第二の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部の連結部に空洞部を形成する工程からなる細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項13】 エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である請求項12に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項14】 第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく請求項12に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項15】 第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においては、エッチングを抑制するガスのみを流して生成物を第一の開口部の壁面に形成する請求項12に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項16】 基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第一の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部の連結部に空洞部を形成する工程とからなる細胞外電位あるいは細胞が発する物理化学的变化を測定する細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項17】 エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である請求項16に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項18】 第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく請求項16に記載の細胞外電位測

定デバイスの製造方法。

【請求項19】 第二の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においては、エッチングを抑制するガスのみを流して生成物を第一の開口部の壁面に形成する請求項16に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【請求項20】 第一の開口部と、第二の開口部と、空洞部を形成した後、第一の開口部より蒸着法またはスパッタ法によって導体材料を第二の開口部と空洞部の一部に形成する請求項16に記載の細胞外電位測定デバイスの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は生体試料特に細胞の電気生理学的評価をこれら生体試料が発する電気化学的変化を指標にして、簡易に高速に行う細胞外電位測定デバイスおよびその製造方法に関するものであり、たとえば高速薬品スクリーニング装置に用いられる。

【0002】

【従来の技術】

従来、細胞の電氣的活動を指標にして薬品をスクリーニングすることはパッチクランプ法、蛍光色素または発光指示薬を用いる方法により行われている。

【0003】

このパッチクランプ法はマイクロピペットの先端部分に付けた細胞膜の微小部分（パッチと呼ぶ）を用いて、単一のチャネルタンパク質分子を介するイオンの輸送を微小電極プローブによって電氣的に記録する方法であり、この方法は一個のタンパク質分子の機能をリアルタイムで調べることでできる数少ない方法の一つである（たとえば、細胞の分子生物学、第三版、Garland Publishing Inc.、New York、1994、日本語版、中村桂子ら監訳、181～182頁、1995年、教育社）。

【0004】

また、特定のイオンの濃度変化に応じて光を発する蛍光色素または発光指示薬により、細胞内のイオンの移動をモニタすることで細胞の電氣的活動を測定する方法もある。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】

しかしながら、パッチクランプ法ではマイクロピペットの作成及び操作に特殊な技術を必要とし、一つの試料の測定に多くの時間を要するため大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングする用途には適していない。また、蛍光色素などを利用する方法は大量の薬品候補化合物を高速でスクリーニングできるが、細胞を染色する工程が必要で測定においては色素の影響によるバックグラウンドが高い上に時間とともに脱色するためS/N比が悪いという欠点がある。

【0006】

本発明はこのような問題に鑑み、確実に被検体細胞を保持する手段を提供するものである。

【0007】

【課題を解決するための手段】

上記課題を解決するために本発明の請求項1に記載の発明は、基板と、この基板内に被検体細胞及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウエルを有し、このウエルの底部に第一の開口部、第二の開口部及び空洞部を有し、第一の開口部と第二の開口部は空洞部を介して一直線上に連結されることで細胞トラップ孔を構成しており、上記第一の開口部の空洞部側に接続する径は空洞部の径より小さく、第二の開口部の空洞部側に接する径より大きく、なおかつ被検体細胞の大きさより小さい細胞外電位あるいは細胞の発する物理化学的変化を測定する細胞外電位測定デバイスであり、確実に被検体細胞を空洞部の中に閉じこめることができるので、細胞活動によって発生する電氣的信号を確実に検出することができる細胞外電位測定デバイスを実現することができる。

【0008】

請求項2に記載の発明は、基板がシリコンよりなる請求項1に記載の細胞外電位測定デバイスであり、基板材料をシリコンとすることにより第一の開口部、第二の開口部、空洞部の形成が半導体技術を用いて容易になるという製造上の利点を有する。またシリコンの表面は容易に酸化できるので、空洞部を境にして第一の開口部側と第二の開口部側の電気的絶縁を容易に確保できるという利点も有する。

【0009】

請求項3に記載の発明は、基板が少なくとも2種類の基板よりなる積層体であり、2種類の材料は同一の溶液あるいはガスに対してそれぞれ異なるエッチングレートを持つ細胞外電位測定用デバイスであり、基板材料が異なるエッチングレートを持つ2種類の積層体となることにより、第一の開口部、第二の開口部、空洞部の形成が半導体技術を用いて容易になるという製造上の利点を有する。

【0010】

請求項4に記載の発明は、基板がシリコンと二酸化珪素もしくはこれを含むガラス材料との積層体である細胞外電位測定デバイスであり、請求項3と同様の作用効果を有する。さらに、空洞部が二酸化珪素もしくはこれを含むガラス材料の層に形成されていると、これらの層はシリコンに比べて十分に電気絶縁性が高いので、第一の開口部側と第二の開口部側の電気的絶縁が十分に確保できるという利点も有する。

【0011】

請求項5に記載の発明は、第二の開口部の壁面と空洞部の一部においてのみ、導体材料が形成されており、これら導体はウエル側とは電気的に絶縁されている細胞外電位測定デバイスであって、第二の開口部周辺で発生する電気を第一の開口部側に漏らすことなく、確実に検出することができる。

【0012】

請求項6に記載の発明は、第一の開口部の壁面はウエル側の方が空洞部側より大きくなるテーパー構造である細胞外電位測定デバイスであり、上記のように第一の開口部の壁面がテーパー形状となっていることにより、ウエル側から被検体細胞がより進入しやすくなるという利点を有する。

【0013】

請求項7に記載の発明は、第一の開口部のウエル側の大きさは被検体細胞の大きさの2倍より小さい細胞外電位測定デバイスであり、第一の開口部のウエル側の大きさが被検体細胞の大きさの2倍より小さいので、複数の細胞がウエルから同時に進入して第一の開口部の内部で詰まってしまうことがない。

【0014】

請求項8に記載の発明は、空洞部の形状は縦径より横径の方が大きい楕円形状である細胞外電位測定デバイスであり、空洞部が楕円形状であることに加えて縦径の大きさが被検体細胞より小さいので、ウエル側より空洞部に被検体細胞が進入すると、被検体細胞は空洞部内において横径方向につぶれるようになり、また縦方向から押さえられるので、被検体細胞は確実に空洞部内に保持される。

【0015】

請求項9に記載の発明は、同一のウエルの底面に第一の開口部、空洞部、第二の開口部からなる細胞トラップ孔を複数形成してなる細胞外電位測定デバイスであり、同一ウエルの底面に複数の細胞トラップ孔があるので、測定の際にはいずれかの細胞トラップ孔に被検体細胞が保持されれば測定が可能になるという利点を有する。

【0016】

請求項10に記載の発明は、同一のウエルの底面に形成した細胞トラップ孔の第二の開口部の壁面に形成された導体がウエルの下面において互いに短絡されている細胞外電位測定デバイスであり、第二の開口部の壁面に設けられた導体が短絡されているので、細胞トラップ孔にそれぞれ被検体細胞が保持されている場合において、これらの被検体細胞外の電位変化を並列に接続することとなり、一つ一つの被検体細胞の電位変化が少なくても確実に捉えることができる。

## 【0017】

請求項11に記載の発明は、第一の開口部の空洞部に接続する側の大きさは10～50マイクロメートルであり、第二の開口部は1～5マイクロメートルであり、空洞部の横径が10～100マイクロメートルであり、空洞部の縦径は50マイクロメートル以下である細胞外電位測定デバイスであり、このような形状は数十マイクロメートルの被検体細胞をウエル側から進入させ、空洞部内に保持するために最適である。

## 【0018】

請求項12に記載の発明は、基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第二の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部の連結部に空洞部を形成する工程とからなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、被検体細胞を空洞部内に進入させ、確実に保持するための構造である第一の開口部、第二の開口部、空洞部によって構成される細胞トラップ孔の製造方法を提供することができる。

## 【0019】

請求項13に記載の発明は、エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちのいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちのいずれか一つまたは混合である細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、第一の開口部、第二の開口部、空洞部の製造方法をさらに容易にするための方法であり、請求項12に記載の発明における効果を補完する。

## 【0020】

請求項14に記載の発明は、第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッチングを促進するガスの割合を減らすことにより第一の開口部は、ウエル側より空洞部側の開口部の方が小さいテーパ形状とすることができ、ウエルからの被検体細胞の進入を促進させやすくするものである。

## 【0021】

請求項15に記載の発明は、第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においてはエッチングを抑制するガスのみを用いて、保護膜を第一の開口部壁面に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、後の工程で第二の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いて空洞部を形成する際にも、第一の開口部の壁面には保護膜が形成されているので、エッチングを促進するガスによって第一の開口部壁面がエッチングされない製造方法を実現することができる。

## 【0022】

請求項16に記載の発明は、基板にキャビティをエッチングしてウエルを形成する工程と、このウエルの下面に第二の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第二の開口部用のマスクを用いて第二の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を経た後に、上記ウエルの底面に第一の開口部をエッチングするためのマスクをフォトリソによって形成する工程と、この第一の開口部用のマスクを用いて第一の開口部をエッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの2種類を用いてドライエッチングによって形成する工程を備え、さらにこの後、第一の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行って第一の開口部と第二の開口部を連結部に空洞部を形成する工程とからなる細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、被検体細胞を空洞



部内に入らせ、確実に保持するための構造である第一の開口部、第二の開口部、空洞部によって構成される細胞トラップ孔の製造方法を提供することができる。

#### 【0023】

請求項17に記載の発明は、エッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{XeF}_2$ のうちいずれか一つまたは混合であり、エッチングを抑制するガスは $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ のうちいずれか一つまたは混合である細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、第一の開口部、第二の開口部、空洞部の製造方法をさらに容易にするための方法であり、請求項16記載の発明における効果を補完する。

#### 【0024】

請求項18に記載の発明は、第一の開口部をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル側から空洞部側に進むに従ってエッチングを促進するガスの割合を減らしていく細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、エッチングを促進するガスの割合を減らすことにより第一の開口部はウエル側より空洞部側の開口部の方が小さいテーパー形状とすることができ、ウエルからの被検体細胞の進入を促進させることができる。

#### 【0025】

請求項19に記載の発明は、第二の開口部をエッチングする工程において、エッチングを終了する直前においては、エッチングを抑制するガスのみを用いて保護膜を第二の開口部壁面に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、後の工程で第一の開口部側からエッチングを促進するガスのみを用いて空洞部を形成する際にも、第二の開口部の壁面には保護膜が形成されているのでエッチングを促進するガスによって第二の開口部壁面がエッチングされることはないのである。

#### 【0026】

請求項20に記載の発明は、第一の開口部と、第二の開口部と、空洞部を形成した後、第一の開口部より蒸着法またはスパッタ法によって導体材料を第二の開口部と空洞部の一部に形成する細胞外電位測定デバイスの製造方法であり、この方法により、空洞部の上部には導体が形成されないで、空洞部を境に第一の開口部側と第二の開口部側の電気的絶縁を確実に確保する製造方法を提供することができる。

#### 【0027】

##### 【発明の実施の形態】

以下、本発明の細胞外電位測定デバイスおよびその製造法について実施の形態および図面を用いて説明する。

#### 【0028】

##### (実施の形態1)

本発明の実施の形態1及び図1～図22、図29により請求項1、2、および請求項5～20に記載の発明を説明する。図1は本発明の実施の形態における細胞外電位測定デバイスの一実施の形態を示した斜視図であり、図2はその断面図、図3は同断面図の拡大図である。

#### 【0029】

図1～図3の細胞外電位測定デバイスは、シリコンよりなる基板1にウエル2が設けられ、このウエル2の底面3には第一の開口部4と第二の開口部5が空洞部6を介してこれらは一直線上に連結されており、これらにより細胞トラップ孔が複数個構成されている。第一の開口部4の径は空洞部6より小さく、第二の開口部5より大きい。

#### 【0030】

これらの具体的な大きさは、被検体細胞の大きさによって最適に決められるものであるが、大きさの順書は変わるものではない。たとえば被検体細胞の径を25マイクロメートルであるとすると、第一の開口部4は25マイクロメートルより小さい20マイクロメートルとし、空洞部6の径は被検体細胞の大きさより大きい35マイクロメートルとし、第二の開口部5は被検体細胞より小さい10マイクロメートル程度としておけばよい。この他、被検体細胞の大きさは小さいもので数マイクロメートル、大きいもので数十マイクロ

メートルであるので、第一の開口部4は10～50マイクロメートル、第二の開口部5は1～5マイクロメートル程度とし、空洞部6の大きさはこれらによって10～100マイクロメートルの間で最適値とすることが望ましい。

#### 【0031】

さらに、図3に示すように少なくとも第二の開口部5の内壁面と空洞部6の下方には金よりなる検出電極7が形成されており、基板1の下面側には金よりなる引き出し電極8が設けられている。検出電極7と引き出し電極8は第二の開口部5で電気的に接続されている。一方、空洞部6の側面および上方には導体は設けられていないので、検出電極7はウエル2側と電気的に絶縁されている。

#### 【0032】

さて、この細胞外電位測定用デバイスについて図面を用いて少し説明する。図4は細胞外電位測定用デバイスに被検体細胞10と培養液11をウエル2に投入したときの様子を断面図で示しており、図5～図9は第一の開口部4、第二の開口部5、空洞部6の部分の拡大断面図である。

#### 【0033】

さて、図4にあるようにウエル2内に培養液11と被検体細胞10を入れると、当初、この被検体細胞10は培養液11中に浮遊している。また、培養液11はウエル2内だけでなく、第一の開口部4、空洞部6、第二の開口部5を満たした後、第二の開口部5側にも流れ出す。このようにすると、浮遊している被検体細胞10はウエル2内の圧力によって、図6に示すように第一の開口部4へ引き込まれる。引き込みの圧力が足りない場合には、第二の開口部5側から吸引ポンプなどの手段により吸引すると、より確実に浮遊している被検体細胞10は第一の開口部4側に吸引される。

#### 【0034】

さて、第一の開口部4の大きさは被検体細胞10より小さくなるよう設計しているもので、図7に示すように被検体細胞10は第一の開口部4を通るときに抵抗を受けるが吸引によって力を受けているので、空洞部6へ到達することができる。図8に示すように、空洞部6内に到達した被検体細胞10は、吸引を止めてもウエル2側より培養液11の圧力を受けている上、第一の開口部4を通るにはサイズが大きく、第一の開口部4はほぼ垂直なため、ウエル2側から吸引されるなどの外力がない限り、簡単にはウエル2側に戻ることができなくなり、空洞部6内に保持される。

#### 【0035】

さらに、空洞部6の形状を図のように縦径より横径が大きい楕円形状にし、縦径が被検体細胞10より小さくなるようにしておけば、被検体細胞10は確実に空洞部6内に保持される。このような状態で、ウエル2内の培養液11に薬剤（図示せず）を投与すれば、薬剤は培養液11内に浸透し、図9のように被検体細胞10が活性化した場合に、第二の開口部5で発生した電気信号は、第二の開口部5に満たされている培養液11の電位を変化させることになるので、この電位の変化は培養液11に接している検出電極7及び引き出し電極8によって外部に取り出される。

#### 【0036】

このように、本発明の細胞外電位測定用デバイスでは、検出電極7はウエル2側とは電気的に絶縁されており、測定の際には被検体細胞10は確実に空洞部6内に保持されている。つまり、第二の開口部5側の培養液11とウエル2側の培養液11とは電気的に絶縁された状態にあるので、細胞の活動により発生する電気信号は、ウエル2側の培養液11に漏れることなく、第二の開口部5側に設けた検出電極7によって検出されるのである。

#### 【0037】

さらに、第一の開口部4は図29に示すように、ウエル2側の方が穴径が広いテーパ形状となっても良い。この場合は、ウエル2側から被検体細胞10の進入をより容易にする。一方で、第一の開口部4の空洞部6側の大きさを空洞部6より小さくしておけば、ウエル2側へ被検体細胞10が戻ることも防げる。これにより、空洞部6へ入った被検体細胞10はウエル2側へは戻らず保持されるので、より細胞の保持率の高い細胞外電位測

定デバイスとすることができ。なお、この場合の開口部の大きさの関係は、大きいものから順に空洞部6の大きさ、第一の開口部4の空洞部側の大きさ、第二の開口部5の大きさとすればよい。

【0038】

なお、本発明の細胞外電位測定デバイスでは、被検体細胞10が細胞トラップ孔の中に入ると、ウエル2側に戻ることはできなくなるが、一度、被検体細胞10の測定を行うとウエル2および細胞トラップ孔内部が汚染されるため、再利用はせず使い捨てになるので被検体細胞10を取り出す必要はない。

【0039】

次に本発明の細胞外電位測定用デバイスを製造する手順について図面を用いて説明する。図10～図19はこの製造手順を説明するための細胞外電位測定用デバイスの断面図である。

【0040】

まず、図10に示すように、シリコン基板1にフォトリソグラフィによってウエル2を形成するためのレジストマスク12を形成し、次に図11に示すように所定の深さになるまでエッチングを行いウエル2を形成する。このときのエッチング方法にはウェットエッチングとドライエッチングがあるが、ウェットエッチングの場合はKOHやTMAH（水酸化テトラ・メチル・アンモニウム液）などのエッチング液、ドライエッチングの場合には $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ などのエッチングガスを用いることができる。

【0041】

次に図12に示すように、第一の開口部4を形成するためのレジストマスク13と、第二の開口部を形成するためのレジストマスク14をそれぞれ、ウエル2の底面およびシリコン基板1の下面に形成する。このとき、第一の開口部4と第二の開口部5の大きさは被検体細胞10の大きさによって変える必要があるが、少なくとも第一の開口部4の方が第二の開口部5より大きくなるようにする。

【0042】

次に図13に示すように、ウエル2側から第一の開口部4のエッチングを所定の深さになるまで行う。このときエッチングの方法としては、ドライエッチングが望ましく、なおかつエッチングガスとしてエッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスを用いる。エッチングを促進するガスには $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ などを用いるが、これらはシリコンのエッチングを深さ方向だけではなく、横方向へも促進する作用がある。そこで、 $\text{CHF}_3$ 、 $\text{C}_4\text{F}_8$ 等のエッチングを抑制するガスを混合させておくことで、エッチングの壁面に $\text{CF}_2$ のポリマーである保護膜を作成するので、エッチングをエッチングマスクの下方のみに進行させることが可能なのである。

【0043】

また、別の方法として、エッチング形状をさらに垂直なものにしたい場合には、エッチングを促進するガスによってエッチングを少しだけ行ったら、エッチングを抑制するガスによって保護膜を少しだけ形成する工程を繰り返すことで、ほぼ垂直なエッチング形状とすることができる。実験では、大きさ20マイクロメートルの第一の開口部4を形成するのに、 $\text{SF}_6$ を130 s c c m流して13秒間プラズマ発生させることで約1マイクロメートルのエッチングを行い、その後 $\text{C}_4\text{F}_8$ を85 s c c m流して7秒間プラズマ発生させて約0.01マイクロメートルの保護膜を形成し、またエッチングを行うということを約60回繰り返した結果、60マイクロメートルの深さのほぼ垂直なエッチング形状とすることができた。

【0044】

なお、エッチングを抑制するガスによって保護膜は第一の開口部4の壁面だけでなく、底面にも形成されるが、底面に形成された保護膜は壁面に形成された保護膜に比べてエッチングを促進するガスによって容易に除去されるので、エッチングは下方のみに進むのである。

【0045】

さらに、このときのエッチング工程においては、エッチングを終了する直前はエッチングを抑制するガスによって保護膜を形成することで終了しておけば、第一の開口部4の壁面には確実に保護膜が形成されるので、後の工程において、空洞部6を形成する際にも第一の開口部4の壁面が侵されることがない。

#### 【0046】

次に、図14に示すように、ウエル2の下面側から第二の開口部5を形成するためのエッチングを行う。ここでも第一の開口部4を形成する際と同様、エッチングを促進するガスとエッチングを抑制するガスの切り替えによるエッチングを行って壁面をほぼ垂直になるよう形成しておく。

#### 【0047】

さらに、第一の開口部4の場合と同様、エッチングを終了する直前にはエッチングを抑制するガスによって保護膜を形成して終了しておく。これにより、第二の開口部5の壁面にも保護膜が確実に形成されるので、後の工程において空洞部6を形成する際にも第二の開口部5壁面が侵されることがない。

#### 【0048】

次に、図15に示すように第一の開口部4側から、エッチングを促進するガスのみを用いてエッチングを行う。先ほどの工程で、第一の開口部4の壁面には保護膜が形成されているので、壁面はエッチングによって侵されることがなく、下方にエッチングが進むが、新しくエッチングされたところには保護膜が形成されないで、横方向にもエッチングが進むことになり、結果的に図15に示すように、第一の開口部4と第二の開口部5の間に第一の開口部4より広がった空洞部6が形成されるのである。このエッチング量を適当な量行えば、空洞部6の形状は横径の方が大きい楕円形状となるのである。

#### 【0049】

なお、空洞部6のエッチングの際には第二の開口部5側に貫通された後も第二の開口部5の壁面にも保護膜が形成されているので、空洞部6の大きさが所望の大きさとなるまでしばらくエッチングを続けても、第二の開口部5の壁面が侵されることがない。ここで、あまりエッチングを続けると、横方向のみではなく、図15の点線に示すように全体に広がった形状となるので、適当なところで止める必要がある。

#### 【0050】

なお、この工程におけるエッチングを促進するガスは $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ が利用できるが、望ましくは $\text{XeF}_2$ がもっとも適している。これはこのガスでは保護膜がほとんどエッチングされないで、壁面をほとんど侵することなく空洞部6を形成することが可能なのである。ただし、このガスの場合は、前工程で形成されたエッチング底面の保護膜をエッチングする速度も遅くなるので、これを回避するため、 $\text{XeF}_2$ によるエッチングをする前に $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ 、 $\text{Ar}$ ガスなどを用いて底面の保護膜のみをエッチングすればよい。

#### 【0051】

なお、本実施の形態1では第一の開口部4、第二の開口部5、空洞部6の順番でエッチングを行ったが、この順番は、第二の開口部5、第一の開口部4、空洞部6の順番、あるいは第一の開口部4、空洞部6、第二の開口部5の順番でも可能である。また、空洞部6のエッチングは第二の開口部5側よりエッチングすることも可能であるが、この場合は、空洞部6が第一の開口部4より大きくなるようにエッチング量に注意する必要がある。

#### 【0052】

さて、次に、図16に示すように、すべてのレジストマスクを除去した後、第一の開口部4側から金を蒸着法により付着させ検出電極7を形成する。このように第一の開口部4側から金を蒸着により付着させるターゲットより放出された金粒子は直進性があるので第一の開口部4を通して、図17に示すように第一の開口部4の内壁、空洞部6の下方及び第二の開口部5の内壁のみに蒸着される。つまり、検出電極7は第二の開口部5の内壁と空洞部6の下方にしか形成されないのである。

#### 【0053】

そして、次に図18に示すように、第二の開口部5側より金よりなる引き出し電極8を

蒸着によって形成する。このように形成すると、第二の開口部5は第一の開口部4より十分小さいので、やはり金粒子の直進性によって、第二の開口部5の内壁と第一の開口部4の内壁の一部にしか金は付着しない。つまり、図19でも明らかなように、空洞部6の下方と第二の開口部5に形成された検出電極7と第一の開口部4の内壁に形成された金は電氣的に絶縁されているのである。ここで、金のみでは基板1への密着性が悪い場合はクロム、チタンなどをバフファ層として積層することができる。また、ウエル2の底面へ金が蒸着されると不都合がある場合には、少なくとも第一の開口部4を形成するために設けたレジストマスク12を除去する前に金を蒸着すれば、その後レジストマスク12を除去した後は金はウエル2の底部には形成されないことになる。なお、ここでは金の形成は蒸着法としたが、スパッタ法でも同様の効果は得られる。

#### 【0054】

このようにして、本実施の形態による製造方法によれば、シリコンよりなる基板1に、ウエル2と、ウエル2内に第一の開口部4と第二の開口部5と空洞部6を有し、これら構造によって被検体細胞を確実に空洞部6内に保持することのできる信頼性の高い細胞外電位測定用デバイスを得ることができるのである。

#### 【0055】

なお、本実施の形態1では基板1をシリコンとしたが、ドライエッチングが可能で、ガスの切り替えによって直進性エッチングと横方向エッチングが実現できる基板材料であれば本発明の方法は適用できる。たとえばガラス基板や石英基板は $\text{SF}_6$ 、 $\text{CF}_4$ などのガスにより直進性エッチングが可能で、HFガラスによって横方向のエッチングが可能である。

#### 【0056】

なお、本実施の形態1では、第一の開口部4はほぼ垂直な穴となるようにしたが、第一の開口部4の壁面を空洞部6側の径よりウエル2側の径の方が大きいテーパー形状にしたい場合には、第一の開口部4をエッチングする工程において、エッチングを抑制するガスとエッチングを促進するガスの割合を、エッチングがウエル2側から空洞部6側に進むに従って、エッチングを促進するガスの割合を減らしていけばよい。これによって、図20のように第一の開口部4の壁面がテーパー形状となり、図21のように空洞部6を形成した後には被検体細胞10の進入をしやすく、空洞部6に入った被検体細胞10はウエル2側へ戻りにくい形状とすることができる。

#### 【0057】

なお、第一の開口部4の壁面がテーパー形状となるようにするには、その他、エッチングを促進するガスのみでエッチングすることでも可能である。この場合は図22のようにレジストマスク13で作成した径よりウエル2側の第一の開口部4の大きさが広がるので、最適なテーパー形状となるようあらかじめレジストマスク13の大きさを決めておく必要がある。

#### 【0058】

##### (実施の形態2)

本発明の実施の形態2及び図23～図28により請求項3、4に記載の発明を説明する。実施の形態2では、基板の材料としてシリコンと二酸化珪素もしくはこれを含むガラス材料との積層体である場合について説明する。

#### 【0059】

図23は本発明の実施の形態2における細胞外電位測定用デバイスの斜視図であり、図24はその断面図、図25は同拡大断面図である。実施の形態1と違うところは、基板21が第一のシリコン層22と二酸化珪素層23と第二のシリコン層24の積層体となっているところである。そして、第一の開口部26は第一のシリコン層22に、第二の開口部27は第二のシリコン層24に、空洞部28は二酸化珪素層23にそれぞれ形成されている。

#### 【0060】

また、検出電極29は第二の開口部27の内壁と、空洞部28の下方のみに形成されて

おり、引き出し電極 30 はウエル 25 の下面に形成されており、検出電極 29 と引き出し電極 30 は第二の開口部 27 付近で電気的に接続されている。

#### 【0061】

これらによって構成された細胞外電位測定デバイスの動作は、実施の形態 1 で述べたものと同じになるので省略するが、二酸化珪素層 23 が第一のシリコン層 22 と第二のシリコン層 24 の間に挟まれているので、二酸化珪素層 23 は両者間の電気的絶縁を高め、第二の開口部 27 側で発生する細胞活動による電気的信号は、第一の開口部 26 側に漏れることなく確実に、検出電極 29 によって検出できるのである。

#### 【0062】

次に実施の形態 2 の細胞外電位測定用デバイスを製造するための手順について説明する。ここでは、実施の形態 1 と同じ方法による工程は説明を省略し、第一の開口部 26、第二の開口部 27、空洞部 28 を形成する工程のみについて説明する。また、基板材料はシリコン層、二酸化珪素層、シリコン層の順番で積層されたものを使用するが、これは SOI 基板として一般に販売されているものであるから特段の説明はしない。

#### 【0063】

まず、図 26 はウエル 25 を第一のシリコン層 22 に形成した後に、第一の開口部 26、第二の開口部 27 を形成するためのレジストマスク 31、32 を形成したところである。そして次に図 27 の拡大断面図に示すように、ウエル 25 の底面および下面側よりドライエッチングによって壁面が垂直になるように、二酸化珪素層 23 に達するまでエッチングを行う。このとき、エッチングは実施の形態 1 と同様、エッチングを促進するガスと抑制するガスをを用いる。さて、このように、二酸化珪素層 23 が挟まれていることにより、第一の開口部 26 と第二の開口部 27 のエッチング時に、二酸化珪素層 23 に到達するまでエッチングすればよいので、所定のエッチング深さになるようエッチング時間を管理する必要が無いという製造上の利点がある。

#### 【0064】

次に、HF 溶液に浸けると、HF 溶液はシリコン層をエッチングせず、二酸化珪素層 23 のみをエッチングするので、図 28 に示すように空洞部 28 が形成される。このときエッチング時間は、空洞部 28 が必要な横方向の大きさになるまでエッチングすればよい。そして、この後の工程は、実施の形態 1 と同様、検出電極 29 と引き出し電極 30 を形成すればよい。また、二酸化珪素層 23 をエッチングする方法としては、他に HF ガスを用いてプラズマエッチングを行っても良い。この場合は HF 溶液の場合と同様、シリコン層をエッチングせず、二酸化珪素層 23 のみをエッチングできるので、実施の形態 1 にあるようにエッチングを長くしすぎると、楕円形状ではなくなってしまうということがない。

#### 【0065】

以上のように、シリコンと二酸化珪素の 2 種類の層を積層した基板 21 を用いることにより、少なくとも第二の開口部 27 の深さと、空洞部 28 の高さがあらかじめ決まっているので、製造がより容易になることに加え、第一の開口部 26 側と第二の開口部 27 側は二酸化珪素層 23 によって電気的に完全に分離されているので、より信頼性の高い細胞外電位測定用デバイスを提供することができるのである。

#### 【0066】

なお、本実施の形態 2 では、シリコン層と二酸化珪素層の 2 種類の材料層を用いて第一のシリコン層 22、二酸化珪素層 23、第二のシリコン層 24 の 3 層構造の基板 21 を用いたが、たとえばシリコン層、二酸化珪素層、シリコン層、二酸化珪素層のように 4 層構造以上にしてもよい。

#### 【0067】

また、シリコン層、二酸化珪素層、シリコン層の順番で積層させた基板 21 を用いたが二酸化珪素層、シリコン層、二酸化珪素層の順番に積層されたものでも可能である。さらに基板 21 を構成する材料としてはシリコンと二酸化珪素の組み合わせの他にシリコンとガラス、アルミとアルミナ、ガラスと樹脂など多数の組み合わせがある。また、基板 21 を構成する材料は 2 種類ではなく 3 種類とし、それぞれの層を変えても同様の効果が得ら

れることが期待される。

【0068】

なお、実施の形態1と同様、第一の開口部26の壁面をテーパ形状にすることが可能であるが、効果、方法は実施の形態1で述べたものと同じであるので説明を省略する。

【0069】

【発明の効果】

以上のように本発明では、基板と、この基板内に被検体細胞及びこれと反応する薬剤を混ぜ合わせる少なくとも一つのウェルを有し、このウェルの底部に第一の開口部、第二の開口部及び空洞部を有し、第一の開口部と第二の開口部は空洞部を介して連結され、第一の開口部の径は空洞部の径より小さく、第二の開口部より大きい構造である細胞外電位測定デバイスを提供します。これによって、被検体細胞は第一の開口部を介して空洞部内に入ることができ、進入後は確実に被検体細胞を空洞部の中に閉じこめることができるので、細胞活動によって発生する電気的信号を確実に検出することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明の実施の形態1による細胞外電位測定用デバイスの斜視図

【図2】

同断面図

【図3】

同断面拡大図

【図4】

同使用方法を示す断面図

【図5】

同拡大断面図

【図6】

同拡大断面図

【図7】

同拡大断面図

【図8】

同拡大断面図

【図9】

同拡大断面図

【図10】

同細胞外電位測定用デバイスの製造方法を示す断面図

【図11】

同断面図

【図12】

同断面図

【図13】

同拡大断面図

【図14】

同拡大断面図

【図15】

同拡大断面図

【図16】

同拡大断面図

【図17】

同拡大断面図

【図18】

同拡大断面図

- 【図 19】  
同拡大断面図
- 【図 20】  
他の製造方法の例を示す拡大断面図
- 【図 21】  
同拡大断面図
- 【図 22】  
他の例を示す拡大断面図
- 【図 23】  
本発明の実施の形態 2 による細胞外電位測定用デバイスの斜視図
- 【図 24】  
同断面図
- 【図 25】  
同拡大断面図
- 【図 26】  
同製造方法を示す断面図
- 【図 27】  
同拡大断面図
- 【図 28】  
同拡大断面図
- 【図 29】  
本発明の実施の形態 1 による他の例の細胞外電位測定デバイスの断面図
- 【符号の説明】
- 1 シリコン基板
  - 2 ウエル
  - 3 底面
  - 4 第一の開口部
  - 5 第二の開口部
  - 6 空洞部
  - 7 検出電極
  - 8 引き出し電極
  - 10 被検体細胞
  - 11 培養液
  - 12 レジストマスク
  - 13 レジストマスク
  - 14 レジストマスク
  - 15 金粒子
  - 16 金粒子
  - 21 基板
  - 22 第一のシリコン層
  - 23 二酸化珪素層
  - 24 第二のシリコン層
  - 25 ウエル
  - 26 第一の開口部
  - 27 第二の開口部
  - 28 空洞部
  - 29 検出電極
  - 30 引き出し電極
  - 31 レジストマスク
  - 32 レジストマスク



【手続補正 2】

【補正対象書類名】図面

【補正対象項目名】図 3 0

【補正方法】削除

【補正の内容】